

1993, **129**: 1~ 32

13 Heinrichs W, Heinrichs M, Schonert H. Growth of protein single crystals in a periodically changing solubility gradient. *J Cryst Growth*, 1992, **122**: 186~ 193

14 Przybylska M. A double cell for controlling nucleation and growth of protein crystals. *J Appl Cryst*, 1989, **22**: 115~ 118

15 Smith H W, Delucas L J. A method for programmable control of reservoir concentrations for protein crystal growth. *J Cryst Growth*, 1991, **110**: 137~ 141

16 Wilson L J, Bray T L, Suddath F L. Crystallization of proteins by dynamic control of evaporation. *J Cryst Growth*, 1991, **110**: 142~ 147

17 Robert M C, Lefaucheux F. Crystal growth gels: principle and applications. *J Cryst Growth*, 1988, **90**: 358~ 367

18 Robert M C, Bernard Y, Lefaucheux F. Study of nucleation-related phenomena in lysozyme solutions, Application to gel growth. *Acta Cryst*, 1994, **D50**: 496~ 503

19 Bernard Y, Degoy S, Lefaucheux F *et al*. A gel-mediated feeding technique for protein crystal growth from hanging drops. *Acta Cryst*, 1994, **D50**: 504~ 507

Optimizing Protein Crystallization. SHU Zhanyong, BI Ruchang (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Optimization of protein crystallization is going to be an important method to obtain protein crystals in high quality. Regarding different crystallization methods, some optimization techniques were attempted and found effective to some extent. However, due to the variety and complexity of protein crystallization, these techniques have not been used in practice. These attempts are introduced and some problems are discussed.

Key words protein crystallization, optimized growth, vapor diffusion, temperature control

谷胱甘肽硫转移酶基因表达的调控*

庞战军 陈 瑗 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 催化内源性或外源性亲电子化合物与谷胱甘肽 (GSH) 结合的谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 超基因家族是一族解毒功能蛋白. 其基因的表达通过不同的机制受多种物质的调控. 根据最近文献资料, 对调控谷胱甘肽硫转移酶基因表达的基因结构、调控机制及氧化应激对谷胱甘肽硫转移酶基因表达的调控作用等作一简要综述.

关键词 谷胱甘肽硫转移酶, 基因调控, 氧化应激, 活性氧

自然界中的各种生物, 为避免受到内源性或外源性化学物质, 尤其是毒性物质的损害, 在进化过程中形成了一套代谢此类物质的解毒酶系统^[1]. 谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase) 同工酶族是该酶系统的重要组成部分, 主要催化各种化学物质及其代谢产物与谷胱甘肽 (GSH) 巯基的共价结合. 此类化学物质包括药物、化疗剂、已知的多种致癌物, 以及氧化应激引起脂质过氧化损伤产生的各种毒性代谢产物 (如羟烯醛等)^[2,3]. GST 的催化反应特性, 决定了其在防止脂质过氧化损伤扩大、抵御及修复 DNA 损伤以降低肿瘤发生

机会^[4], 以及癌细胞对抗癌药物耐药性形成^[2]等方面的重要作用. 本文将对近年来在 GST 基因表达调控方面的研究进展进行综述.

从成功构建与编码 Ya 和 Yc 亚基的 mRNA 互补的 cDNA 被克隆以来, 随着分子生物学技术的应用, 已清楚地认识到 GST 多基因家族的复杂性^[3], GST 同工酶族是一个超基因家族. 综合考虑各种 GST 同工酶的底物特异性、免疫学反应特性及蛋白质和 DNA 的

* 国家自然科学基金资助项目 (39670197).
收稿日期: 1996-07-15, 修回日期: 1996-10-27

序列分析结果, 哺乳动物细胞内的 GST 同工酶可分为 α 、 μ 、 π 、 θ 型及微粒体 GST 五类^[5]. 除微粒体 GST 是三聚体外, GST 同工酶大都是由不同亚基组成的同二聚体或异二聚体^[6], 这种组合只存在于同型 GST 的亚基之间. 但由于历史造成的 GST 同工酶分类方法的多样性, 目前世界上各实验室所采用的 GST 同工酶的命名并不统一. 另外两种应用较为广泛的命名方法是^[6]: a. 按照亚基发现的时间顺序, 以数字编号表示 (如 1、2 ...); b. 按照各亚基于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 表现出来的电泳迁移率, 用符号 Y_x (x 代表电泳区带码, 如 a、b₁、b₂ ... 等) 表示. 目前, 多数 GST 同工酶基因的 cDNA 克隆已被分离出来, 并且确定了某些基因的染色体定位^[5].

1 调控 GST 表达的基因结构

基因的表达与其 5' 端非编码区的调控作

用有关. Rushmore^[7] 对外源性物质激活 GST 亚基 1 (Ya) 基因的转录进行了较为详尽的研究, 证实了存在于 Ya 亚基基因 5' 端非编码区的五个独立的调控元件. 第一个调控元件是位于 -860 至 -850 之间的核苷酸序列, 其核心序列能被 HNF1 (hepatocyte nuclear factor 1) 识别, 并与该基因最大基础表达水平有关; 在 -775 至 -755 核苷酸之间存在着第二个起增强子作用的调控元件, 其包含一个 HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4) 识别序列. 借助于计算机对 Ya 基因的 5' 端非编码区进行序列分析, 发现了另外两个调控元件 XRE (xenobiotic responsive element) 和 GRE (glucocorticoid responsive element), 分别与外源性物质和糖皮质激素对 Ya 基因表达的调控有关. XRE 的核心序列 (GCGTG) 位于 HNF1 序列的上游 -908 至 -899 核苷酸之间, GRE 位于 -1609 至 -1595 核苷酸之间 (图 1). XRE 可以被 Ah 受体-配体复合物识别^[3,7],

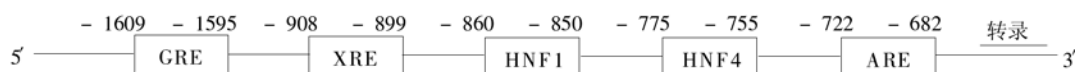


图 1 调控 GST Ya 基因表达的基因结构

并通过 Ah 受体 (Ah 调节基因编码的蛋白质) 与多环芳香族化合物的高亲和性结合而介导多环芳烃等外源性物质对 Ya 基因转录的激活.

人们从 β -萘并黄酮、3-甲基胆蒽和苯并 (a) 芘激活 Ya 基因转录并不通过作用于 Ah 受体和 XRE 这一现象出发, 寻找一种不依赖 Ah 受体的转录激活方式. 缺乏 Ah 受体的细胞受多环芳香族化合物作用不呈现 Ya 基因转录增强, 却对酚类抗氧化剂 (如叔丁基氢醌等) 表现基因表达增加^[7]. 这些酚类抗氧化剂的共同特性是通过氧化还原环生成过氧化阴离子或氢过氧化物, 为此将与之相关的调控元件称为 ARE (antioxidant responsive element), 此即 Ya 基因 5' 端非编码区的第五个顺式反应的调控元件, 是位于 -722 至 -682 之间的核苷酸序列. 经过对 ARE 进行 5' 和 3' 缺失及突

变分析, 发现 ARE 的核心序列 5'-PuGTGAC-NNNGC-3'/3'-PyCACTGNNNCG-5' 与 XRE 的 5'-TNGCGTG-3'/3'-ANCGCAC-5' 截然不同 (N 代表任意核苷酸)^[8]. 同时也表明 ARE 中与诱导 Ya 基因表达有关的核苷酸序列对其基础水平的表达同样重要, -697 位核苷酸上游的核苷酸序列对于基因最大基础水平的表达是必要的, 但对于其表达的诱导则不是必需的^[8]. 在小鼠 GST Ya 亚基的基因中, 也证实了类似于大鼠 GST Ya 基因中 ARE 的结构 EpRE (electrophile responsive element), 含有与 ARE 相同的核心序列^[7]. EpRE 由相邻的两个 Ap1 结合位点构成.

2 GST 基因表达的调控机制

GST Ya 基因表达可能通过以下几种依赖

ARE 的机制^[5]。包括: a. 外源性物质与 Ah 受体结合形成复合物激活细胞色素 P450 CYP1A1 基因的表达, 将外源性物质催化代谢生成带有活性氧基的中间产物, 再作用于 ARE 影响 GST Ya 基因的转录; b. 酚类抗氧化剂或氧化剂如 H₂O₂ 引起氧化应激, 从而直接激活 ARE。如前文所述, Ah 受体与某些外源性物质结合成的复合物还可直接作用于 XRE 激活 GST Ya 基因的转录。在考察原癌基因 c-Fos 及 c-Jun 编码的蛋白质产物对 GST Ya 基因表达的影响时, 发现 Jun/Fos 异二聚体 (Ap-1 转录因子或 Ap-1 复合物) 可以与 EpRE 中两个相邻的 Ap-1 结合位点结合, 以激活该调控元件。Bergelson 等^[9]证实了 EpRE 中位于两个毗邻 Ap-1 结合位点上游的 Ets 结合位点对该调控元件可诱导性的增强作用。原癌基因 c-ets 的蛋白质产物 Ets 蛋白, 可能与 EpRE 结合的 Ap-1 复合物反应, 从而激活 GST Ya 基因的转录。尽管大鼠 ARE 也可以被 Ap-1 复合物激活^[10], 且结构上与典型的 Ap-1 结合位点有某些相同序列, 但 ARE 不是 Jun/Fos 异二聚体 (Ap-1 复合物) 的高亲和力结合位点^[11]。这提示存在一种不包括 Ap-1 蛋白的信号传递通路, 现通常认为是产生了活性氧。

常被作为“肿瘤标志物”的大鼠 GST-P (人类 GST- π) 在正常肝组织中只有痕量存在, 而在增生结节 (癌前病变区) 和肝癌细胞中增加 50~100 倍, 说明在肝化学致癌发生过程中, GST-P 表达增强。对 GST-P 基因调控序列的研究, 已经知道其至少含有一个沉默子和两个增强子区域^[7]。两个增强子 GPE I 和 GPE II, 分别位于转录起始点上游 -2.5 kb 和 -2.0 kb 处。GPE I 含有一个 TRE (TPA responsive element) 共同顺序, 是 Ap-1 结合位点。与 GPE I 增强效应有关的基本核苷酸序列是位于其 3' 端 TRE 样的八个核苷酸, 由两个不完整的 TRE 构成, 其中的任何一个都不单独具有活性, 但协同作用则表现为一个强大的增强子。除原癌基因 c-Fos 和 c-Jun 编码

的蛋白产物外, 业已发现新的转录因子与 GPE I 序列结合影响基因的转录。同时, 也证实存在与 GST-P 基因沉默子结合的蛋白质^[12]。因此, GST-P 基因的表达受多种因子和调控元件的调控, 存在着非常复杂的调控机制^[13]。

Hales 等^[14]在研究大鼠胚胎发育过程中 GST Yp 亚基 (组成 GST-P 的亚基) 表达的调控时发现, 在 GST Yp 基因表达的过程中, 不仅有转录水平的调节, 也有转录后因素的调控。

对 μ 型 GST 基因表达的了解^[7], 已经知道糖皮质激素可以增强其中一种仓鼠 GST- μ 基因的表达。在其基因结构中有两个可由糖皮质激素诱导的调节区, 但不含典型的 GRE。该基因的表达依赖于某些蛋白质的合成, 提示其诱导机理是通过一种间接途径。

Christensen 等^[15]给刚断奶的大鼠分别饲以缺乏、足量和超剂量的含硒食物, 测定肝、肾 GST 的活性及 Ya、Yc、Yp 基因的表达, 结果发现硒缺乏或超剂量硒饮食均使组织 GST 活性增加, 而基因的转录却不受影响, 稳定的 GST 亚基相应的 mRNA 水平则因食物中的含硒量、组织及亚基类别的不同而各异。说明硒对 GST 的基因表达有影响, 并可能存在一种与硒的生理作用有关的 GST 基因调控机制。

3 氧化应激对 GST 基因表达调控作用

从发现 GST 基因非编码区的 ARE 结构以来, 活性氧作为信号传导路径介导真核生物对氧化应激反应而致 GST 基因表达的改变正受到人们的重视。GST 与其他抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSHPx) 等在组织中的协调表达^[5], 更支持了氧化应激在 GST 基因表达调控方面的重要作用。对于通过作用于 ARE 引起基因表达增强的外源性物质来说, 生成活性氧的中间代谢产物是其对 GST 基因表达发挥调控作用的必要步骤。对于胚胎发育的研究, 也说明 GST 基因具有组织特异性及发育期特异性的表达是

胚胎对抗氧化应激损伤的重要反应^[5, 14]。原癌基因蛋白质产物 Fos/ Jun (Ap-1) 复合物可增强 GST 基因的表达, 已知活性氧可以通过增强 c-Fos 和 c-Jun 基因的转录间接对 GST 基因的表达进行调控^[10]。两项对氧化应激损伤的研究为活性氧对 GST 基因表达的调控作用提供了更详细的证据。大鼠 GST 8-8 (小鼠 GST 4-4, 人类 GST 5. 8) 是 α 型 GST 家族的一员, 相对特异地催化 4-羟基壬烯醛 (4-HNE) 和脂肪酸环氧化物与 GSH 的结合, 并对脂肪酸的氢过氧化物表现出非硒谷胱甘肽过氧化物酶活性。给大鼠注射超负荷的铁剂以诱导脂质过氧化产生 4-HNE 及其他脂质过氧化产物, 可检测到同时伴有的大鼠肝内 GST 8-8 的选择性增多^[16]; 给大鼠注射以铁螯合剂 Fe-NTA (ferric nitrilotriacetate) 使其肾近曲小管细胞 GST-P 表达增强^[17]。这也支持了特异性催化底物对 GST 同工酶基因表达的选择性诱导作用。Pinkus 等^[18]研究了不同醌介导产生的羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 与 GST 基因表达的关系, 证明氧自由基的产生与 GST Ya 基因的表达密切相关。

目前已被公认, GST 基因的表达受细胞内氧化应激水平的调控。GSH 作为细胞抵抗氧化应激的主要抗氧化剂, 不仅与 GST 催化功能的发挥直接有关, 并且可清除氧自由基, 对调节细胞内的氧化还原水平起重要作用, 所以细胞内 GSH 的含量调控 GST 的基因表达^[10]。这涉及到细胞内 GSH 水平对原癌基因 c-Fos 及 c-Jun 转录的影响和对 GST 基因调控区 Ap-1 结合活性受化学物质诱导作用的调节。氧化应激在调控 GST 基因表达的同时, 也同样通过活性氧诱导 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH 合成的限速酶) 增加 GSH 的合成^[18], 作为细胞对氧化应激反应的重要部分之一。与此一致的是, GSH 等巯基化合物可以抑制 GST Ya 基因的表达及对 Ap-1 结合活性的诱导^[10]。

4 结 语

长期以来, 人们选择 GST 结构与人类相

似程度较高的大鼠 GST Ya 亚基基因作为研究对象, 研究其基因表达, 以推测人类 GST 基因的调控。已经清楚地知道, 氧化应激对 GST 基因的表达起着重要作用。包括 β -萘并黄酮、3-甲基胆蒽、叔-丁基氢醌、PMA、苯巴比妥、反-4-苯丁烯-2-酮、氢过氧化物、砷酸盐、亚砷酸盐、重金属及多环芳香族化合物在内的多种化学物质^[10]都可以通过直接或间接地产生活性氧, 改变细胞内的氧化还原状态及 GSH 水平, 继而调控 GST 基因的表达。但氧化应激作用于与 GST 表达有关的调控元件的分子机制尚有待进一步阐明。另外, GST 同工酶族中的不同亚类在胚胎发育过程中不同的组织特异性表达, 肝癌、结肠癌、肾癌等肿瘤发生过程中 μ 型 GST Yb2 亚基基因表达的缺失^[19], H_2O_2 不能诱导类风湿性关节炎关节滑液中成纤维细胞 GST 基因的表达^[20]等这些现象, 都将在 GST 基因的组织特异性调控机制上引起人们的兴趣。

参 考 文 献

- 1 Sheehan D, Casey J P. Microbial glutathione S-transferases. *Comp Biochem Physiol*, 1993, **104B** (1): 1~ 6
- 2 Ciaccio P J, Tew K D. Adaptive response to glutathione S-transferase inhibitors. *Br J Cancer*, 1996, **74** (S27): S93~ S98
- 3 Pickett B, Lu Y H. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem*, 1989, **58**: 743~ 764
- 4 Heagerty A, Smith A, English J *et al*. Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: significant interactions between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. *Br J Cancer*, 1996, **73**: 44~ 48
- 5 Hayes J D, Strange R C. Invited commentary: potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad Res*, 1995, **22** (3): 193~ 207
- 6 Boyer T D. The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology*, 1989, **9** (3): 486~ 496
- 7 Rushmore T H, Pickett C B. Glutathione S-transferase, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem*, 1993, **268** (16): 11475~ 11478
- 8 Rushmore T H, Morton M R, Pickett C B. The antioxidant responsive element. *J Biol Chem*, 1991, **266** (18): 11632 ~ 11639
- 9 Bergelson S, Daniel V. Cooperative interaction between ets and AP-1 transcription factors regulates induction of glutathione S-transferase Ya gene expression. *Biochem Biophys*

- Res Commun, 1994, **200** (1): 290~ 297
- 10 Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/ Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res*, 1994, **54**: 36~ 40
 - 11 Nguyen T, Rushmore T H, Pickett C B. Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. *J Biol Chem*, 1994, **269** (18): 13656~ 13662
 - 12 Osada S, Takano K, Nishihara T *et al.* CCAAT/enhancer binding proteins α and β interact with the silencer element in the promoter of glutathione S-transferase P gene during hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem*, 1996, **270** (52): 31288~ 31293
 - 13 Moffat G J, McLaren A W, Roland Wolf C. Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 1054~ 1060
 - 14 Hales B F, Huang C. Regulation of the Yp subunit of glutathione S-transferase P in rat embryos and yolk sacs during organogenesis. *Biochem Pharmacol*, 1994, **47** (11): 2029 ~ 2037
 - 15 Christensen M J, Nelson B L, Wray C D. Regulation of glutathione S-transferase gene expression and activity by dietary selenium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **202** (1): 271~ 277
 - 16 Khan M F, Srivastava S K, Singhal S S *et al.* Iron-induced lipid peroxidation in rat liver is accompanied by preferential induction of glutathione S-transferase 8-8 isozyme. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, **131** (1): 63~ 72
 - 17 Fukuda A, Osawa T, Oda H *et al.* Oxidative stress response in iron-induced renal carcinogenesis: acute nephrotoxicity mediates the enhanced expression of glutathione S-transferase Yp isozyme. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **329** (1): 39~ 46
 - 18 Pinkus R, Weiner L M, Daniel V. Role of quinone mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry*, 1995, **34** (1):

81~ 88

- 19 Stalker M J, Kocal T E, Quinn Bette Anne *et al.* Reduced expression of glutathione S-transferase Yb2 during progression of chemically induced hepatocellular carcinomas in fischer 344 rats. *Hepatology*, 1994, **20** (1 Pt1): 149~ 158
- 20 Matthey D L, Nixon N, Aldersea J E *et al.* Alpha, mu and Pi class glutathione S-transferases in human synovium and cultured synovial fibroblasts: effects of interleukin 1 α , hydrogen peroxide and inhibition of eicosanoid synthesis. *Free Rad Res Commun*, 1993, **19** (3): 159~ 171

Regulation of Glutathione S-Transferase Gene Expression. PANG Zhanjun, CHEN Yuan, ZHOU Mei (*Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract The proteins expressed by the glutathione S-transferase (GST) supergene family which catalyze the conjugation of endogenous or exogenous electrophiles with glutathione (GSH) are a family of detoxicating proteins, the gene expression of which is regulated by many sorts of compounds through different mechanisms. A brief review for the gene structure and regulation mechanisms associated with the expression of GSTs, and the action of oxidative stress in the regulation of GST gene expression was made.

Key words glutathione S-transferase (GST), gene expression, regulation, oxidative stress, reactive oxygen species

检测脱氨基速率的超灵敏方法及应用

陈 洪

(Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA)

李雨民¹⁾

(中国医学科学院
放射医学研究所, 天津 300192)

摘要 脱氨基被认为是引起细胞突变的主要因素, 如果这些脱氨基的产物不被修复, 将引起转换 (transition) 突变. 为了理解DNA结构和其化学活性的关系, 介绍一种新的灵敏的遗传学方法, 它应

¹⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1996-07-15, 修回日期: 1996-11-15